梨小食心虫化学感受蛋白 cDNA 的克隆、序列分析及原核表达

张国辉，刘彦飞，仵均祥*
（西北农林科技大学植物保护学院，植保资源与病虫害治理教育部重点实验室/
西北农林科技大学应用昆虫学重点实验室，陕西杨凌 712100）

摘要：为了研究梨小食心虫 *Grapholita molesta* 化学感受蛋白(chemosensory proteins, CSPs)在化学感受系统中的作用，本研究利用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆到一条梨小食心虫化学感受蛋白的全长 cDNA 序列，命名为 *GmolCSP*(GenBank 登录号：JQ821389)。序列分析表明，*GmolCSP* 开放阅读框序列为 384 bp，编码 127 个氨基酸残基，预测 N 末端含有 18 个氨基酸组成的信号肽序列，其成熟蛋白的预测分子量为 12.80 kD，等电点为 8.33。该基因编码的氨基酸序列与其他鳞翅目昆虫化学感受蛋白的氨基酸序列具有较高同源性。RT-PCR 结果显示，*GmolCSP* 在梨小食心虫成虫触角、去触角的头、胸、腹、足和翅中都有表达。将 *GmolCSP* 重组到表达载体 pET-32a 中，转入大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)进行表达。SDS-PAGE 和 Western 印迹检测结果显示，梨小食心虫化学感受蛋白基因在大肠杆菌中成功地表达出一个分子量约为 29 kD 的融合蛋白，与预测的融合蛋白分子量大小一致。本研究结果为进一步研究该蛋白的分子结构和功能奠定了良好基础。

关键词：梨小食心虫；化学感受蛋白；分子克隆；序列分析；原核表达；融合蛋白
中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2012)06-0668-08

cDNA cloning, sequence analysis and prokaryotic expression of a chemosensory protein from the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae)

ZHANG Guo-Hui, LIU Yan-Fei, WU Jun-Xiang* (Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pest Management, Ministry of Education/Key Laboratory of Applied Entomology, College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to clarify the physiological function of chemosensory proteins (CSPs) in the olfactory system of *Grapholita molesta*, the full-length cDNA encoding a chemosensory protein was isolated from *G. molesta* by using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends-PCR (RACE-PCR), and named as *GmolCSP* (GenBank accession no. JQ821389). The results of sequence analysis indicated that the open reading frame (ORF) of *GmolCSP* is 384 bp in length, encoding 127 amino acid residues, with the deduced molecular weight (MW) of 12.80 kD and isoelectric point (pI) of 8.33. The deduced amino acid sequence of *GmolCSP* showed a high identity to CPSs of other lepidopteran insects. RT-PCR analysis revealed that *GmolCSP* was expressed in antennae, head, thorax, abdomen, wings and legs of the test moth. *GmolCSP* was then constructed into the expression vector pET-32a and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) after induction with IPTG. SDS-PAGE and Western Blot analysis confirmed the molecular weight of the recombinant GmolCSP is 29 kD, consistent with the predicted result. The results in this study are helpful for further research on molecular structure and function of GmolCSP.

Key words: *Grapholita molesta*; chemosensory protein; molecular cloning; sequence analysis; prokaryotic expression; fusion protein

昆虫在长期的进化过程中逐渐形成了高度灵敏的化学感受系统，通过其中的化学感器接触和分析

基金项目：农业部公益性行业(农业)科研专项(201103024)
作者简介：张国辉，男，1983 年生，博士研究生，从事昆虫生态与害虫综合治理研究，E-mail: zhangguohuiji@163.com
*通讯作者 Corresponding author, E-mail: junxw@nwsuaf.edu.cn
收稿日期 Received: 2012-04-01; 接受日期 Accepted: 2012-05-23

外界信息，以完成其寻偶、觅食和产卵等生命活动(Schneider, 1969)。在这个过程中，把外界信息刺激物送达嗅觉受体并引发昆虫神经冲动反应的主要有两大类分子发挥作用。一类是气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs)，包含普通气味结合蛋白(general odorant binding proteins, GOBP)和性信息素结合蛋白(pheromone binding proteins, PBPs)；另一类是化学感受蛋白(chemosensory proteins, CSPs)。这两类蛋白与外界信息刺激物的作用是昆虫嗅觉感受的关键步骤。自 1981 和 1994 年分别发现了第一个气味结合蛋白和第一个化学感受蛋白后，昆虫嗅觉机制研究的大门逐步打开(Vogt and Riddiford, 1981; Mckenna *et al.*, 1994; Pikielny *et al.*, 1994)。到目前为止已在鳞翅目(Nagnan-Le *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2011)、膜翅目(Briand *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2009)、半翅目(Gu *et al.*, 2011; 马双等, 2011)、直翅目(Angeli *et al.*, 1999; Ban *et al.*, 2003a,2003b)等多种昆虫中发现它们的存在。

气味结合蛋白分子量约为 16 kD，氨基酸序列中的 6 个保守半胱氨酸形成 3 个二硫键(Pelosi and Maida, 1995)，一般仅分布于昆虫触角专一执行嗅觉功能，而化学感受蛋白比 OBP 略小，约为 13 kD，包含 4 个保守的半胱氨酸组成 2 个二硫键(Xu *et al.*, 2009)，广泛分布于昆虫各种感觉器官中而具有多种功能，如嗅觉功能、运输化学感受器中亲脂性配体、免疫功能、调节昆虫生理节律和发育等(龚亮等, 2009)。虽然当前没有直接的证据证明化学感受蛋白具有嗅觉功能，但是大量的组织定位及配体结合实验数据均揭示化学感受蛋白在昆虫化学感受过程中具有重要作用(Lartigue *et al.*, 2002; Ban *et al.*, 2003b; 邓培渊等, 2011; 张天涛等, 2011; 马双等, 2011)。

梨小食心虫 *Grapholita molesta* 属鳞翅目卷蛾科，是世界性分布的重要果树害虫。目前主要依赖化学农药进行防治，虽然有一定控制作用，但由于梨小食心虫钻蛀危害，隐蔽性强而使效果较差；加之该虫一年多代，需多次用药，不仅引起抗药性日渐增强，而且导致果品农药残留和环境污染加重。利用信息化合物防治害虫是一项极具前景的绿色防治技术，在国内外都已有应用实例。显然，针对梨小食心虫对信息化合物的感受机制，对梨小食心虫化学感受蛋白进行研究，不仅有利于揭示该虫化学感受机制，而且可为研制高效引诱剂或驱避剂提供重要的理论依据。鉴于此，本研究利用昆虫 CSPs 氨基酸序列同源性，设计简并引物，采用 RT-PCR 及 RACE 技术首次对梨小食心虫化学感受蛋白 cDNA 序列进行了克隆，并在原核细胞中表达其编码序列及 RT-PCR 检测其组织表达特异性，以期为进一步研究梨小食心虫化学感受蛋白的结构和功能，以及研究梨小食心虫化学感受过程提供良好的基础。

1　材料和方法

1.1　供试材料

供试昆虫：梨小食心虫幼虫由本实验室用人工饲料饲养(杜娟等, 2010)，饲养条件：温度 24 ± 0.5℃，相对湿度 70% ± 10%，光周期为 15L:9D。成虫羽化后第 3 天，剪下其触角、去触角的头、胸、腹、足和翅用于提取总 RNA。

菌种及质粒：pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司，大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 和 BL21(DE3)购自北京全式金生物技术有限公司，表达质粒 pET-32a(+)购自 Novagen 公司。

主要试剂和工具酶：总 RNA 提取试剂 RNApure 购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司，反转录试剂盒、RACE 试剂盒、限制性内切酶、ExTaq DNA 聚合酶、核酸分子量标准、蛋白质分子量标准均购自 TaKaRa 公司，T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司，其他试剂均为国产或进口分析纯试剂。

1.2　总 RNA 提取及 cDNA 合成

取梨小食心虫成虫触角 50 根，用液氮研磨后，按照 RNA 提取试剂说明书提取总 RNA，经电泳与分光度计检测后，根据 TaKaRa 公司反转录试剂盒说明书进行反转录反应获得第一链 cDNA。

1.3　梨小食心虫化学感受蛋白全长 cDNA 序列的克隆

比较已报道的鳞翅目昆虫化学感受蛋白基因的 cDNA 序列，根据保守区设计简并引物扩增梨小食心虫 CSP 基因片段(CSP-c1 和 CSP-c2，表 1)。PCR 反应条件：94℃预变性 3 min，接着进行 35 个循环：94℃ 60 s，50℃ 60 s，72℃ 60 s，最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后切胶回收纯化，克隆于 pGEM-T Easy 载体，送样测序(南京金斯瑞生物科技有限公司)。根据获得的梨小食心虫化学感受蛋白基因片段设计 5′和 3′RACE 引物

(CSP5′ outer, CSP5′ inner, CSP3′ outer, CSP3′ inner 表 1)。按照 TaKaRa 公司的 5′和 3′RACE 试剂盒说明书进行 5′和 3′ RACE RCR 扩增。然后将 RACE RCR 产物割胶回收纯化，克隆于 pGEM-T Easy 载体，送样测序，将获得的片段进行拼接获得化学感受蛋白的全长 cDNA 序列。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences (5′-3′)	引物用途 Primer use
CSP-c1	TACACKGACAAATGSGAC	cDNA 克隆
CSP-c2	MTCRGGGTCGTAYTT	cDNA cloning
CSP-5′outer	CCTGAGAGCTCCTTCCAAATATC	
CSP-5′inner	TCTGTGCACTTGGCACACTCG T	5′和 3′扩增
CSP-3′ outer	TGGAGAACGAGTGTGCCAAGTG	5′ and 3′ cDNA end isolation (RACE)
CSP-3′ inner	GCACAGAAAAGCAGAAGCAAGGATC	
CSP-full1	ATGAGGCTTCTAATTGCTATTG	基因全长验证
CSP-full2	ATTCCATTTATTGCTTGACC	Full-length confirmation
CSP-gsp1	ATGAGGCTTCTAATTGCTATTG	
CSP-gsp2	ATTCCATTTATTGCTTGACC	组织定位
Actin-gsp1	CTTT CACCACCACCGCTG	Tissue localization (RT-PCR)
Actin-gsp2	CGCAAGATTCCATACCCA	
CSP-ex1	CG **GAATTC**CGGCCTCAAACGAAGTACACCAG	原核表达
CSP-ex2	CCC **AAGCTT**TTATTGCTTGACCTT TTCTAGCTGG	Prokaryotic expression

酶切位点用下划线标出 The restriction sites are underlined.

1.4 序列分析

序列相似性搜索使用在线工具(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)；信号肽查找使用在线软件 SingalP 分析(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)；序列比对使用 Vector NTI 9 软件；进化树构建使用 MEGA 4.0 软件中的 Neighbor-joining 法。

1.5 梨小食心虫化学感受蛋白基因的表达谱分析

根据总 RNA 提取试剂 RNApure 说明书分别提取梨小食心虫成虫触角、去触角的头、胸、腹、足和翅的总 RNA，DNase Ⅰ处理后，经反转录酶合成 cDNA 作为 RT-PCR 的模板。与此同时，相应的各组织总 RNA 再分别做一次不加反转录酶的反转录反应作为阴性对照的模板，以检测基因组 DNA 的污染。用梨小食心虫化学感受蛋白基因特异性引物(CSP-gsp1, CSP-gsp2, 表 1)进行 PCR 扩增。以梨小食心虫 Actin 基因(GenBank 登录号：JN857938)作为内参基因(Atin-gsp1, Actin-gsp2, 表 1)。扩增条件：94℃ 预变性 3 min，接着进行 30 个循环：94℃ 60 s, 50℃ 60 s, 72℃ 60 s，最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 表达载体构建

根据已获得的梨小食心虫化学感受蛋白基因的 ORF 序列设计 1 对去信号肽的化学感受蛋白表达引物(CSP-ex1, CSP-ex2)；为了便于将目的基因亚克隆到表达载体上，在正向引物、反向引物中分别设计了 *Eco*R Ⅰ和 *Hin*d Ⅲ酶切位点(以下划线表示)(表 1)。用该引物进行 PCR 扩增，将 PCR 产物克隆到 pGEM-T Easy 载体，进行蓝白斑筛选，选取白色菌落过夜培养，提取质粒，经双酶切鉴定后送样测序。将测序正确的重组质粒 pGEM-T/*GomlCSP* 经 *Eco*R Ⅰ和 *Hin*d Ⅲ酶切，割胶回收纯化后，与经同样双酶切的表达质粒 pET-32a(+)连接，构建表达载体 pET/*GomlCSP*，然后转化克隆菌株 DH5α，培养过夜后挑取单菌落，摇菌过夜，提取质粒，经双酶切鉴定后测序。测序正确的表达载体用于后续原核表达。

1.7 化学感受蛋白基因的原核表达

将上述测序正确的表达载体转化表达菌株 BL21(DE3)，培养过夜后，挑取单菌过夜摇菌，提取质粒进行双酶切鉴定，将鉴定后的阳性克隆单菌落于 4 mL LB 培养基(含 100 μg/mL 氨苄青霉素)

过夜培养，次日以 1/100 稀释 37℃继续培养，当 OD_{600} 达到 0.6 左右，加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导目的蛋白的表达。28℃ 200 r/min 继续诱导 5 h。收集菌液，12 000 r/min 离心 5 min，去上清。加入 100 μL 1×SDS 凝胶加样缓冲液后振荡悬浮菌体，煮沸 10 min 后 SDS-PAGE 电泳分析表达情况。

1.8　融合蛋白可溶性检测

为了检测表达蛋白的可溶性，将大肠杆菌诱导培养菌液超声波破碎，4℃ 12 000 r/min 离心 10 min，分别收集上清和沉淀，经处理后进行 SDS-PAGE 检测。

1.9　融合蛋白的 Western 印迹检测

将蛋白从 SDS-PAGE 胶上转移到 PVDF 膜上，用封闭液（TBST+5%脱脂奶粉）封闭过夜；接着与鼠抗 6×His 单克隆抗体室温反应 1 h，用 TBST 洗膜 5 次；加入使用 TBST 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗，室温反应 1 h，用 TBST 洗膜 5 次；最后将 PVDF 膜置于显色液中显色至条带清晰，将膜放入蒸馏水中终止显色反应后拍照。

2　结果与分析

2.1　梨小食心虫化学感受蛋白基因的克隆与序列分析

以梨小食心虫触角 cDNA 第一链为模板，根据设计的简并引物进行 PCR 扩增，得到一条 264 bp 的化学感受蛋白基因片段。通过 RACE PCR 得到化学感受蛋白全长 cDNA 序列，命名为 *GmolCSP*（GenBank 登录号：JQ821389）。序列测定结果表明，该基因序列读码框全长为 384 bp，编码 127 个氨基酸残基，N 末端含有 18 个氨基酸组成的信号肽，成熟蛋白预测分子量为 12.80 kD，等电点为 8.33，并且氨基酸序列中具有 4 个保守半胱氨酸的典型化学感受蛋白家族标志（图 2，图 3）。为了证明 5′和 3′RACE RCR 扩增片段源自于同一基因，根据拼接的序列设计了一对特异性引物（CSP-full1，CSP-full2，表 1），该引物经 PCR 扩增获得一条特异性条带（图 1），测序结果与拼接序列一致，说明 5′和 3′RACE PCR 扩增片段源自同一基因。利用 BLAST 对梨小食心虫化学感受蛋白的同源蛋白进行搜索，对搜索结果进行氨基酸序列的多重对比结果表明（图 2，表 2），梨小食心虫化学感受蛋白氨基酸序列与云杉卷叶蛾 *Choristoneura fumiferana* 化学感受蛋白 3 的一致性最高，为 73%；其次是与烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 化学感受蛋白 2，一致性为 68%；但与云杉卷蛾化学感受蛋白 4 的一致性仅为 40%，而与其他昆虫的化学感受蛋白仅具有 34%~46% 的相似性。同时系统进化树的构建（图 4）也得出类似结果。

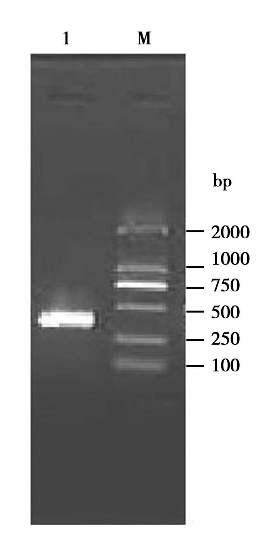


图 1　梨小食心虫化学感受蛋白基因 *GmolCSP* 的 PCR 扩增

Fig. 1　PCR amplification of *GmolCSP* from *Grapholita molesta*

M：标准分子量 DL2000 Molecular weight marker DL2000；1：目标基因 *GmolCSP*.

2.2　梨小食心虫化学感受蛋白基因 *GmolCSP* 的表达谱

通过 RT-PCR 技术分析 *GmolCSP* 在不同组织中的表达分布发现（图 5），该基因在梨小食心虫成虫触角、去触角头、胸、腹、足和翅中都有表达。

2.3　梨小食心虫化学感受蛋白基因 *GmolCSP* 在大肠杆菌中的表达

将鉴定好的重组质粒 pET/*GmolCSP* 转化工程菌 BL21，经 IPTG 诱导后，产生了 29 kD 左右的特异性蛋白条带，IPTG 诱导的含表达载体 pET-32a（+）的 BL21 菌株在相应位置没有产生条带，而是产生了 22 kD 左右条带（图 6）。另外，诱导后的含重组表达载体的大肠杆菌 BL21 超声破碎后，经 SDS-PAGE 电泳检测上清和沉淀表明，目的蛋白在上清液和包涵体中都得到表达（图 7）。为了进一步检测表达产物是不是含有 6×His 表达标签的融合蛋白，以鼠抗 6×His 为一抗，以辣根过氧化酶标记的羊抗鼠为二抗，对表达产物的 Western 印迹分析表明，经 IPTG 诱导产生的 29 kD 的蛋白条带与 6×His 抗体发生很强的交叉反应，表明融合蛋白得到表达（图 8）。

表 2　梨小食心虫化学感受蛋白 GmolCSP 与其他鳞翅目昆虫化学感受蛋白的相似性(%)矩阵

Table 2　Comparison of homology (%) of GmolCSP with CSPs from other lepidopteran insects

	GmolCSP	HassCSP	HzeaCSP	HvirCSP3	PrapCSP	BmorCSP	CfumCSP4	CfumCSP3	AipsCSP	HvirCSP2	HvirCSP1	MbraCSP	SlitCSP
GmolCSP	100												
HassCSP	43	100											
HzeaCSP	42	97	100										
HvirCSP3	39	82	82	100									
PrapCSP	43	60	59	57	100								
BmorCSP	38	31	32	27	35	100							
CfumCSP4	40	34	33	32	37	50	100						
CfumCSP3	73	44	44	38	44	38	39	100					
AipsCSP	34	64	62	78	48	31	34	34	100				
HvirCSP2	68	49	48	45	44	34	38	71	37	100			
HvirCSP1	46	49	49	54	52	37	36	44	52	45	100		
MbraCSP	42	40	40	38	44	34	29	44	34	44	72	100	
SlitCSP	41	43	43	40	51	37	34	46	35	43	59	56	100

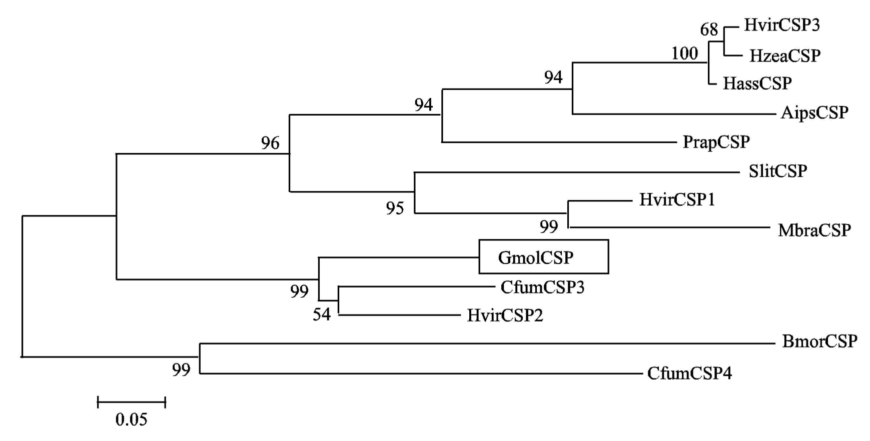


图 4　梨小食心虫化学感受蛋白 GmolCSP 与其他鳞翅目昆虫 CSPs 的系统发育树

Fig. 4　Phylogenetic analysis of amino acid sequences of GmolCSP and other lepidopteran CSPs

图中的数值代表 bootstrap 为 1 000 次时的支持度值，标尺代表遗传距离。Bootstrap support values based on 1 000 replicates are indicated, and the scale bar indicates the phylogenetic distance.

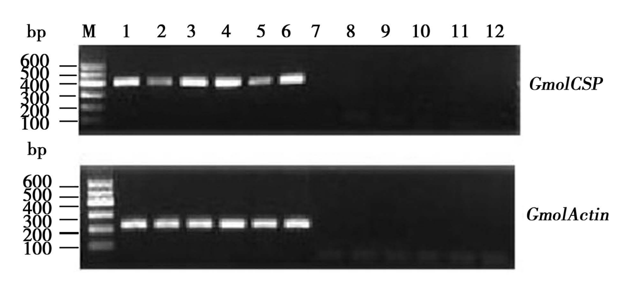


图 5　梨小食心虫化学感受蛋白基因 *GmolCSP* 在不同组织中的表达谱

Fig. 5　The expression pattern of *GmolCSP* in different tissues of *Grapholita molesta*

1：触角 Antenna；2：头(去触角) Head (antenna removed)；3：胸 Throax；4：腹 Abdomen；5：足 Leg；6：翅 Wing；7 - 12：1 ~ 6 各组织对应的在反转录过程中没加反转录酶的阴性对照 Negative control without using the reverse transcriptase for each cDNA sample [antenna, head (antenna removed), thorax, abdomen, leg and wing, respectively)].

3　讨论

本研究通过 RT-PCR 和 RACE 技术，克隆了编码梨小食心虫化学感受蛋白 GmolCSP 的 cDNA 全长序列。序列分析表明，由它们推导的氨基酸序列的基本物理性状均符合昆虫化学感受蛋白家族的特征，特别是化学感受蛋白序列中的 4 个保守的半胱氨酸(图 3)。同源性比较发现(表 1)，梨小食心虫化学感受蛋白氨基酸序列与云杉卷叶蛾化学感受蛋白 3 的一致性最高，为 73%；其次是与烟芽夜蛾化学感受蛋白 2，一致性为 68%；而与其他昆虫的化学感受蛋白仅具有 34%~46% 的一致性，这反映了化学感受蛋白在几种昆虫间亲缘关系的远近。值得

characterization, cloning and immunocytochemical localization of chemoreception proteins from *Schistocerca gregaria*. *European Journal of Biochemistry*, 262: 745 – 754.

Ban L, Scaloni A, Ambrosio CD, Zhang L, Yan Y, Pelosi P, 2003a. Biochemical characterization and bacterial expression of an odorant-binding protein from *Locusta migratoria*. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, 60: 390 – 400.

Ban L, Scaloni A, Brandazza A, Angeli S, Zhang L, Yan Y, Pelosi P, 2003b. Chemosensory proteins of *Locusta migratoria*. *Insect Molecular Biology*, 12(2): 125 – 134.

Briand L, Swasdipan N, Nespoulous C, Bezirard V, Blon F, Huel JC, Ebert P, Penollet JC, 2002. Characterization of a chemosensory protein (ASP3c) from honeybee (*Apis mellifera* L.) as a brood pheromone carrier. *European Journal of Biochemistry*, 269(18): 4586 – 4596.

Deng PY, Qiao HL, Li DD, Lu YF, Li SC, Kan YC, 2011. Expression pattern and binding specificity of chemosensory protein BmCSP4 in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomologica Sinica*, 54(8): 869 – 876. [邓培渊，乔惠丽，李丹丹，鲁云风，李生才，阚云超，2011. 家蚕化学感受蛋白 BmCSP4 表达谱及结合特性分析. 昆虫学报，54(8)：869 – 876]

Gong L, Chen Y, Cheng G, Zhong GH, 2009. Insect chemosensory proteins. *Chinese Bulletin of Entomology*, 46(4): 646 – 652. [龚亮，陈永，程功，钟国华，2009. 昆虫化学感受蛋白. 昆虫知识，46(4)：646 – 652]

Gu SH, Wang SP, Zhang XY, Wu KM, Guo YY, Zhou JJ, Zhang YJ, 2011. Identification and tissue distribution of odorant binding protein genes in the lucerne plant bug *Adelphocoris lineolatus* (Coeze). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41: 254 – 263.

Jacobs SP, Liggins AP, Zhou JJ, Pickett JA, Field LM, 2005. OS-D-like genes and their expression in aphids (Hemiptera: Apididae). *Insect Molecular Biology*, 14(4): 423 – 432.

Lartigue A, Campanacci V, Roussel A, Larsson AM, Jones TA, Tegoni M, Cambillau C, 2002. X-ray structure and ligand binding study of a moth chemosensory protein. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35): 32094 – 32098.

Li HL, Lou BG, Cheng JA, Gao QK, 2007. The chemosensory protein of Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*: molecular cloning of cDNA, immunocytochemical localization and expression. *Chinese Science Bulletin*, 52(8): 903 – 909. [李红亮，楼兵干，程家安，高其康，2007. 中华蜜蜂化学感受蛋白 cDNA 克隆、定位及其表达. 科学通报，52(8)：903 – 909]

Liu JX, Zhong GH, Xie JJ, Guan S, Hu MY, 2005. Recent advances in chemosensory proteins of insects. *Acta Entomologica Sinica*, 48(3): 418 – 426. [刘金香，钟国华，谢建军，官珊，胡美英，2005. 昆虫化学感受蛋白研究进展. 昆虫学报，48(3)：418 – 426]

Ma S, Wang SY, Gu SH, Hao ZB, Zhang YJ, Guo YY, 2011. Odorant binding characteristics of chemosensory protein Alin-CSP6 in lucerne plant bug, *Adelphocoris lineolatus* (Coeze). *Scientia Agricultura Sinica*, 44(14): 2926 – 2934. [马双，王松莹，谷少华，郝再彬，张永军，郭予元，2011. 苜蓿盲蝽化学感受蛋白 Alin-CSP6 的气味结合特性. 中国农业科学，44(14)：2926 – 2934]

Mckenna MP, Hekmat-Scafe DS, Gaines P, 1994. Putative *Drosophila* pheromone-binding proteins expressed in a subregion of the olfactory system. *Journal of Biological Chemistry*, 269(23): 16340 – 16347.

Nagnan-Le Meillour P, Cain AH, Jacquin-joly E, Francois MC, Ramashadran S, Maida R, Steinbrecht RA, 2000. Chemosensory proteins from the proboscis of *Mamestra brassicae*. *Chemical Senses*, 25: 541 – 553.

Pelosi P, Maida R, 1995. Odorant-binding proteins in insects. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 111(3): 503 – 514.

Picimbon JF, Dietrich K, Angeli S, Scaloni A, Krieger J, Breer H, Pelosi P, 2000. Purification and molecular cloning of chemosensory proteins from *Bombyx mori*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 44(3): 120 – 129.

Picimbon JF, Dietrich K, Krieger J, Breer H, 2001. Identity and expression pattern of chemosensory proteins in *Heliothis virescens* (Lepidoptera, Noctuidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 1173 – 1181.

Pikielny CW, Hasan G, Rouyer F, Rosbash M, 1994. Members of a family of *Drosophila* putative odorant-binding proteins are expressed in different subsets of olfactory hairs. *Neuron*, 12(1): 35 – 49.

Schneider D, 1969. Insect olfaction: deciphering system for chemical messages. *Science*, 163(3871): 1031 – 1037.

Tuccini A, Maida R, Rovero P, 1996. Putative odorant-binding protein in antennae and legs of *Carausius morosus* (Insecta, Phasmatodea). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 26(1): 19 – 24.

Vogt RG, Riddiford LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293: 161 – 613.

Xiu WM, Zhou YZ, Dong SL, 2008. Molecular characterization and expression pattern of two pheromone-binding proteins from *Spodoptera litura* (Fabricius). *Journal of Chemical Ecology*, 34: 487 – 498.

Xu YL, He P, Zhang L, Fang SQ, Dong SL, Zhang YJ, Li F, 2009. Large-scale identification of odorant-binding proteins and chemosensory proteins from expressed sequence tags in insects. *BMC Genomics*, 10(1): 632.

Zhang TT, Gu SH, Wu KM, Zhang YJ, Guo YY, 2011. Construction and analysis of cDNA libraries from the antennae of male and female cotton bollworms *Helicoverpa armigera* (Hübner) and expression analysis of putative odorant-binding protein genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 407: 393 – 399.

Zhang TT, Zou LY, Li KM, Feng JN, Zhang YJ, Guo YY, 2011. Expression profiling and binding characterization of dimeric chemosensory protein 6 (HarmCSP6) in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 54(6): 615 – 622. [张天涛，邹朗云，李科明，冯纪年，张永军，郭予元，2011. 棉铃虫化学感受蛋白 HarmCSP6 二聚体的组织表达分析及气味结合特征. 昆虫学报，54(6)：615 – 622]

Zhang ZC, Wang MQ, Lu BL, Zhang GA, 2009. Molecular characterization and expression pattern of two general odorant binding proteins from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Journal of Chemical Ecology*, 35: 1188 – 1196.

（责任编辑：赵利辉）